

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau internationalReference No.: C
Filing Date: 06/13/2006
Application No.: 10/582,696

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)...

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/11, A01H 5/00 C12N 15/05, C12Q 1/68	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 92/05251 (43) Date de publication internationale: 2 avril 1992 (02.04.92)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/00741 (22) Date de dépôt international: 20 septembre 1991 (20.09.91) (30) Données relatives à la priorité: 90/11670 21 septembre 1990 (21.09.90) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 145, rue de l'Université, F-75341 Paris Cédex 07 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BONHOMME, Sandrine [FR/FR]; 75, boulevard Richard-Lenoir, F-75011 Paris (FR). BUDAR, Françoise [FR/FR]; 58, rue du Flamant-Rose, F-91470 Limours (FR). LANCELIN, Dominique [FR/FR]; 39, rue du Pr.-Vincent, Résidence Ville-Reine, F-78530 Buc (FR). PELLETIER, Georges [FR/FR]; 28, avenue de L'Espérance, F-91440 Bures/Yvette (FR).		(74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), CS, DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), HU, IT (brevet européen), JP, KR, LU (brevet européen), NL (brevet européen), PL, RO, SE (brevet européen), SU ⁺ , US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale</i> <i>Avec revendications modifiées</i>
(54) Title: DNA SEQUENCE IMPARTING CYTOPLASMIC MALE STERILITY, MITOCHONDRIAL GENOME, NUCLEAR GENOME, MITOCHONDRIA AND PLANT CONTAINING SAID SEQUENCE AND PROCESS FOR THE PREPARATION OF HYBRIDS (54) Titre: SEQUENCE D'ADN CONFERANT UNE STÉRILITÉ MALE CYTOPLASMIQUE, GENOME MITOCHONDRIAL, GENOME NUCLEAIRE, MITOCHONDRIE ET PLANTE CONTENANT CETTE SEQUENCE, ET PROCÉDE DE PRÉPARATION D'HYBRIDES (57) Abstract <p>Ogura sterility DNA sequence that, when present in the cytoplasm of a plant, imparts cytoplasmic male sterility to said plant. The invention also concerns a mitochondrial genome, a nuclear genome, a mitochondria and a cytoplasm containing said sequence. It further relates to a plant belonging to the genus Brassica containing said genome, a process for preparing hybrid plants using such a plant, and a hybrid so obtained.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne une séquence d'ADN stérilité Ogura qui confère lorsqu'elle est présente dans le cytoplasme d'une plante, une stérilité mâle cytoplasmique à ladite plante. Elle concerne également un génome mitochondrial, un génome nucléaire, une mitochondrie et un cytoplasme contenant cette séquence. Elle concerne aussi une plante appartenant au genre Brassica contenant ce génome et un procédé de préparation de plantes hybrides utilisant une telle plante, ainsi qu'un hybride ainsi obtenu.</p>		

+ DESIGNATIONS DE "SU"

Toute désignation de "SU" produit ses effets dans la Fédération de Russie. On ignore encore si une telle désignation produit ses effets dans les autres Etats de l'ancienne Union soviétique .

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brésil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU ⁺	Union soviétique
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE*	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

1

SEQUENCE D'ADN CONFERANT UNE STERILITE MALE CYTOPLASMIQUE,
GENOME MITOCHONDRIAL, GENOME NUCLEAIRE, MITOCHONDRIE ET
PLANTE CONTENANT CETTE SEQUENCE, ET PROCEDE DE PREPARATION
D'HYBRIDES

La présente invention se rapporte à un matériel biologique possédant une stérilité mâle utile pour le développement de variétés hybrides d'espèces d'intérêt agronomique.

Elle concerne en particulier une plante appartenant à la
5 famille des cruciféracées dont le cytoplasme des cellules contient des organites possédant des séquences nucléotidiques conférant une stérilité mâle et de bonnes caractéristiques agronomiques.

Le développement de variétés hybrides peut être facilité ou rendu possible par l'utilisation d'un système de stérilité mâle cytoplasmique. Les hybrides sont obtenus par la fécondation croisée entre deux
10 populations parentales, l'une jouant le rôle de mâle, l'autre de femelle. L'un des écueils rencontrés lorsque l'on souhaite obtenir des variétés hybrides de qualité uniforme par croisement sexué sur des espèces autogames, est la capacité de la plante à s'auto-polliniser. Les systèmes de
15 stérilité mâle permettent d'obtenir des plantes femelles incapables de s'autoféconder et sur lesquelles après pollinisation on peut récolter directement les graines qui sont toutes hybrides sans avoir recours à des techniques laborieuses telle que la castration des fleurs.

Parmi les déterminants génétiques de la stérilité mâle, il en est qui sont portés par le cytoplasme. A chaque génération sexuée ils sont
20 transmis exclusivement par la mère. On obtient ainsi 100 % de mâle-stériles à chaque génération avec un système de stérilité-mâle cytoplasmique (CMS). Ces déterminants génétiques sont portés par le génôme des mitochondries.

25 Un système de stérilité mâle cytoplasmique approprié chez les cruciféracées est défini par les caractéristiques suivantes :

- 1) La stérilité mâle doit être totale, c'est à dire que quelles que soient les conditions de culture et quelle que soit la lignée que l'on veut utiliser
30 comme parent femelle, il ne doit pas y avoir de production de pollen. Dans le cas contraire, les graines récoltées sur ces plantes femelles seraient en partie issues d'autofécondation et ne seraient donc pas du type hybride FI.

- 2) La production de ces graines doit être réalisée en profitant des vecteurs naturels du pollen, c'est à dire dans le cas de ces espèces des hyménoptères, des diptères, et le vent. Le pollen doit être transporté des plantes pollinisatrices sur les plantes mâle-stériles (femelles). En fait seuls les insectes peuvent assurer ce transport à distance chez les cruciféracées.

Les plantes femelles, par conséquent, doivent être suffisamment attractives pour les insectes qui viennent y chercher le nectar. La morphologie des fleurs doit contraindre l'insecte à effectuer cette recherche par le sommet de la fleur de façon à ce que son thorax, principalement, entre en contact avec le stigmate. Pratiquement cela revient à dire que la base des pétales doit former une sorte de tube autour de la base du pistil.

- 3) La morphologie des organes femelles (pistil) doit être identique à celle d'une plante fertile, en particulier un seul pistil par fleur et de forme rectiligne. En effet, il arrive souvent que des stérilités mâles se traduisent aussi par une féminisation des anthères qui se transforment en pseudopistils et même par la transformation des nectaires en fleurs complètes. Il arrive aussi que le ou les pistils ainsi produits soient déformés. Toutes ces aberrations ne permettent pas une bonne production de graines, et l'on peut parler d'une certaine stérilité femelle.

- 4) Pour la production de variétés hybrides F1 chez les espèces dont on récolte les graines, comme le colza ou les moutardes, il est indispensable que le parent mâle de l'hybride annule totalement l'effet du cytoplasme mâle stérile, de telle sorte que les plantes hybrides soient facilement pollinisées.

Chez les Cruciféracées le premier cas de cytoplasme mâle stérile ou CMS a été décrit par Ogura (1968) chez le radis, *Raphanus sativus*. Bannerot (1974, 1977) a transféré le cytoplasme Ogura chez les Brassicacées, obtenant ainsi des plantes qui possèdent une stérilité mâle cytoplasmique. Ces mêmes plantes ne présentaient pas des caractéristiques agronomiques satisfaisantes (chlorose lors de l'abaissement des températures, mauvaise fertilité femelle) d'où un mauvais rendement les rendant inaptes à l'utilisation commerciale.

Chez les crucifères pour éviter cette chlorose, il convient d'associer dans la même cellule les génomes nucléaires et chloroplastiques d'un même genre. Ainsi des plantes de Brassicacées possédant l'un des génomes chloroplastiques des Brassicacées ne présentent plus de chlorose. Si elles possèdent la totalité du génome mitochondrial Ogura elles présentent une stérilité mâle cytoplasmique totale mais cependant les fleurs auront une morphologie aberrante rendant impossible leur pollinisation par les vecteurs naturels.

En outre, pour les espèces où l'intérêt réside dans les graines, il convient de restaurer la fertilité mâle des variétés hybrides que l'on commercialise par l'intermédiaire de gènes nucléaires dits restaurateurs.

Il est difficile de restaurer la fertilité mâle de plantes possédant la totalité du génome mitochondrial Ogura car il est nécessaire de faire intervenir simultanément plusieurs gènes restaurateurs.

Nous nous sommes proposé d'obtenir un système de stérilité mâle approprié en éliminant les gènes responsables des caractères indésirables du cytoplasme Ogura tout en gardant une stérilité mâle efficace et facile à restaurer.

C'est pourquoi la présente invention se rapporte à une séquence d'ADN que nous appellerons "stérilité Ogura", caractérisée en ce que :

- a) elle est portée par une séquence d'ADN délimitée par les nucléotides 928 et 2273 de la figure 1, ou
- b) elle présente au moins 50 % d'homologie avec ladite séquence mentionnée en a),

et confère, lorsqu'elle est présente dans le génome mitochondrial ou nucléaire d'une plante, une stérilité mâle cytoplasmique à ladite plante.

En particulier, la présente invention a pour objet une séquence d'ADN stérilité Ogura, caractérisée en ce que :

- c) elle est portée par la séquence délimitée par les nucléotides 928 et 1569 de la figure 1, ou
- 5 d) elle présente au moins 50 % d'homologie avec ladite séquence mentionnée en c)

et en ce qu'elle est transcrite en ARN dans les mitochondries de plantes mâle-stériles

Dans ce qui suit, on se référera aux figures suivantes :

- 10 **FIGURE 1 :** Séquence nucléotidique du fragment d'ADN mitochondrial de radis Ogura portant le caractère CMS.

FIGURE 2 : Carte de restriction du fragment d'ADN mitochondrial décrit fig. 1.

- 15 **FIGURE 3 :** Electrophorèse d'ADN mitochondrial après digestion par BglI (3a) et NruI (3b). Les bandes révélées correspondent à une hybridation avec une sonde CoxI. (Hiesel et al. 1987).

FIGURE 4 : Electrophorèse d'ADN mitochondrial après digestion par Sall. Les bandes révélées correspondent à une hybridation avec une sonde délimitée par les nucléotides n° 389 et 1199 de la séquence décrite fig. 1.

- 20 **FIGURE 5 :** Fruits produits par des plantes de chou portant différents génômes cytoplasmiques.

FIGURE 6 : Electrophorèse d'ARN mitochondrial. Les bandes révélées correspondent à une hybridation avec une sonde, fragment EcoRI - Bam HI, incluant une partie de la séquence dite ORF B.

- 25 La séquence d'ADN stérilité Ogura est définie par rapport à la séquence délimitée par les nombres 1 et 2428 sur la figure 1. Elle est portée par une séquence transcrite dont les extrémités 3' et 5' sont reliées par un pointillé sur la figure 2, et qui est observée uniquement chez les plantes mâle-stériles. ORF B correspond à un cadre de lecture ouvert ;
- 30 cette appellation a été donnée d'après l'homologie observée avec une séquence décrite par Brennicke. Sur la figure 2, on a représenté en hachuré la séquence correspondant à l'un des deux gènes de l'ARN de transfert formylméthionine.

La séquence d'ADN délimitée par les nucléotides numérotés 928 et 2273 sur la figure 1 correspond à un transcrit qui peut être visualisé par hybridation moléculaire (1,4) comme on le voit sur la figure 6. Sur cette figure 6, chaque puits correspond à une plante fertile (F) ou mâle-stérile (S). Seules les plantes mâle-stériles synthétisent un transcrit d'environ 1400 bases. Ce transcrit débute à la position 928 (± 10 bases) de la séquence figure 1 et se termine à la position 2273 (± 5) (l'initiation et l'arrêt de transcription peuvent se produire à différentes positions dans les mitochondries végétales).

De manière préférée, la présente invention se rapporte à un cytoplasme comportant une séquence d'ADN présentant au moins 50 % d'homologie avec la séquence délimitée par les nucléotides 928 et 2273 de la figure 1 conférant le caractère CMS ou un cytoplasme comportant une séquence d'ADN présentant au moins 50 % d'homologie avec la séquence délimitée par les nucléotides 928 et 1569 de la figure 1, et transcrite en ARN, conférant le caractère CMS et caractérisé en ce qu'il comporte :

- des chloroplastes de la même espèce que le génome nucléaire ou d'une autre espèce mais compatibles avec ce génome nucléaire,
- ne comporte pas tout ou partie de l'un ou l'autre (ou des deux) fragments du génome mitochondrial Ogura, défini ci-après :
 - . portant l'un des deux gènes de l'ARN de transfert formyl-méthionine servant à l'initiation de la traduction,
 - . portant le gène Cox1, codant pour la sous unité n° 1 de la cytochrome oxydase.

L'absence de ces fragments, dits "séquences indésirables", est nécessaire pour obtenir des génomes mitochondriaux correspondant à une stérilité mâle de bonne qualité, répondant aux 4 caractéristiques définies plus haut.

Selon un autre de ses aspects, l'invention se rapporte à un génome nucléaire ou mitochondrial végétal recombiné, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence d'ADN stérilité Ogura,

- a) qui est portée par une séquence d'ADN comprise entre les nucléotides 928 et 2273 de la séquence représentée sur la figure 1, ou

b) qui présente au moins 50 % d'homologie avec ladite séquence mentionnée en a),

et confère lorsqu'il est présent dans le cytoplasme d'une plante, une stérilité mâle cytoplasmique à ladite plante.

5 En particulier, l'un des objets de la présente invention, est un génôme nucléaire ou mitochondrial végétal recombiné, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence d'ADN stérilité Ogura,

c) qui est portée par une séquence délimitée par les nucléotides numérotés 928 et 1569 sur la figure 1,

10 d) qui présente au moins 50 % d'homologie avec ladite séquence mentionnée en c)

et confère, lorsqu'elle est présente dans le cytoplasme d'une plante et est transcrite en ARN, une stérilité mâle cytoplasmique à ladite plante.

15 Un génôme nucléaire ou mitochondrial selon l'invention peut être caractérisé en ce que ledit génôme recombiné est dépourvu de tout ou partie des fragments de génôme Ogura :

- portant l'un des deux gènes de l'ARN de transfert formylméthionine servant à l'initiation de la traduction,
- portant le gène *cox1*, codant pour la sous unité n°1 de la cytochrome oxydase,

20 ou dans lequel lesdits fragments sont inactifs.

Plus précisément, un génôme nucléaire ou mitochondrial recombiné selon l'invention peut être caractérisé:

25 1) en ce qu'il est dépourvu de tout ou partie d'un fragment d'environ 10,7 kb après digestion par *Bgl*II ou d'un fragment d'environ 11 kb après digestion par *Nru*I, porteurs du gène *cox1*.

Ceci est mis en évidence notamment sur la figure 3, par hybridation moléculaire avec une sonde portant la séquence *Cox1*.

30 2) en ce qu'il est dépourvu de tout ou partie d'un fragment de 5,1 kb après digestion par *Sal*I, ou d'un fragment d'environ 15 kb après digestion par *Nru*I, ou environ 18,5 kb après digestion par *Bgl*II, porteurs de l'un des deux gènes de l'ARN de transfert formylméthionine.

Ceci est mis en évidence notamment sur la figure 4, par

hybridation moléculaire avec une sonde délimitée par les nucléotides n° 389 et 1199 de la séquence décrite figure 1.

Sur les figures 3 et 4, les génotypes désignés par des chiffres correspondent à des plantes présentant un système de stérilité mâle cytoplasmique approprié.

	GENOTYPES	CHLOROPLASTES	MITOCHONDRIES
	B.n	B. napus	B. napus
	27	B. napus	B. napus/Ogura
10	OGU.	R. sativus (OGU)	R. sativus (OGU)
	9, 17, 21, 24, 27c	B. oleracea	B. oleracea/Ogura
	B.o	B. oleracea	B. oleracea

Par ailleurs, l'existence d'un catabolisme CMS de bonne qualité nécessite la présence d'une séquence d'ADN qui peut être repérée par des hybridations ADN/ADN sur des digestions. C'est ainsi que la présente invention se rapporte à une séquence d'ADN telle qu'elle a pu être définie et caractérisée en ce qu'elle comporte une séquence qui après digestion par NcoI donne un fragment de 2,5 kb, après digestion par NruI donne un fragment de 6,8 kb, et après digestion par SalI donne un fragment de 4,4 kb.

Cette séquence peut également être repérée par des hybridations sur l'ARN total de plantes mâle-stériles. Un transcrit d'environ 1400 paires de bases est mis en évidence. Il est absent des plantes retournant à la fertilité.

La définition des séquences nucléotidiques "indésirables" et de séquences nucléotidiques "indispensables" à une stérilité Ogura selon l'invention permet de sélectionner, par des techniques d'hybridation d'ADN connues de l'homme de métier, un matériel végétal portant des chloroplastes compatibles avec le génome nucléaire et portant des mitochondries de bonne qualité sans attendre d'avoir une plante adulte et l'apparition des fleurs et des fruits. On a donc un outil très performant pour sélectionner des plantes possédant un cytoplasme mâle-stérile ayant de bonnes caractéristiques agronomiques.

Selon un autre aspect, l'invention se rapporte à une mitochondrie caractérisée en ce qu'elle contient une séquence nucléotidique correspondant à un ADN présentant au moins 50 % d'homologie avec la séquence délimitée par les bases numérotées 928 et 2273 sur la figure 1 et
5 codant pour la stérilité mâle cytoplasmique d'Ogura ; ou bien la mitochondrie contient une séquence d'ADN portée par la séquence délimitée par les nucléotides 928 à 1569 de la figure 1 ou présentant 50 % d'homologie avec cette séquence, et qui est transcrite en ARN dans les mitochondries de plantes mâle-stériles. Cet ADN peut présenter en outre
10 les caractéristiques définies plus haut, notamment l'absence des séquences indésirables.

La présente invention se rapporte également à un cytoplasme de Cruciféracée, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence d'ADN "stérilité Ogura" présente dans le génôme mitochondrial ; ce cytoplasme
15 contient en outre des chloroplastes de la même espèce ou d'une autre espèce mais compatibles avec le génôme nucléaire.

La séquence stérilité Ogura est caractérisée en ce que :

- a) elle est portée par la séquence d'ADN de 2428 paires de bases représentée sur la figure 1,
- 20 b) elle est délimitée par les nucléotides 928 et 2273 de la figure 1 et correspond à un transcrit indiqué par les pointillés figure 2 et visualisé par hybridation moléculaire (1,4) figure 6,
- c) elle présente au moins 50 % d'homologie avec ladite séquence mentionnée en b), et confère lorsqu'elle est présente dans le génôme
25 mitochondrial d'une plante, une stérilité mâle cytoplasmique à ladite plante,
- ou
- d) elle est portée par la séquence délimitée par les nucléotides 928 à 1569 de la figure 1 et est transcrite en ARN dans les mitochondries de
30 plantes stériles, ou
- e) elle présente au moins 50 % d'homologie avec la séquence décrite en d) et est transcrite en ARN dans les mitochondries de plantes stériles.

La présente invention se rapporte également à une plante de la famille des Cruciféracées, caractérisée en ce qu'elle contient des
35

chloroplastes et un noyau de la même espèce ou compatibles, et des mitochondries portant un génôme conférant le caractère CMS tel que défini ci-dessus.

5 Plus précisément, la présente invention se rapporte également à une plante appartenant au genre Brassica, caractérisée en ce qu'elle contient des chloroplastes et un noyau de Brassica, et des mitochondries portant un génôme conférant le caractère CMS tel qu'il a été défini ci-dessus.

10 Ce génôme mitochondrial doit également porter un certain nombre de gènes de l'espèce Brassica considérée. Ceci est obtenu par recombinaison entre le génôme Ogura et le génôme Brassica.

En particulier, la présente invention se rapporte à une plante appartenant à l'espèce Brassica napus, caractérisée en ce qu'elle comporte un noyau de Brassica, et que le cytoplasme renferme des chloroplastes de 15 Brassica et des mitochondries mâle-stériles portant un ADN selon la présente invention tel qu'il a été défini plus haut ; ces mitochondries peuvent porter également la plupart des gènes mitochondriaux de Brassica napus (18S, Atp9, Atp6, CoxII, ndh1, cob). Brassica napus correspond au Colza, ou Canola et Rutabaga.

20 La présente invention se rapporte à une plante de l'espèce Brassica oleracea, caractérisée en ce qu'elle comporte un noyau de Brassica et en ce que le cytoplasme renferme des chloroplastes de Brassica et des mitochondries comportant une séquence d'ADN codant pour le caractère CMS telle qu'elle a été définie.

25 Brassica oleracea recouvre les divers types de choux : choux pommés, de Bruxelles, raves, brocolis, fourragers et choux fleurs.

La présente invention se rapporte également à une plante de l'espèce Brassica campestris, caractérisée en ce qu'elle comporte un noyau de Brassica et en ce que le cytoplasme renferme des chloroplastes de 30 Brassica compatibles avec le génôme nucléaire et des mitochondries comportant une séquence d'ADN codant pour le caractère CMS telle qu'elle a été définie.

Brassica campestris correspond à navette, navets, choux chinois, de Pékin et japonais.

35

De manière analogue, la présente invention se rapporte à une plante choisie dans le groupe comprenant : *B. juncea*, *B. nigra*, *B. hirta*, *carinata*, caractérisée en ce qu'elle comporte un noyau de Brassica et en ce que le cytoplasme renferme des chloroplastes de Brassica compatibles avec le génôme nucléaire et des mitochondries comportant une séquence d'ADN codant pour le caractère CMS telle qu'elle a été définie.

Selon un autre de ses aspects, la présente invention a pour objet une plante appartenant au genre Brassica et dont le génôme nucléaire comporte une séquence stérilité Ogura telle que définie ci-dessus, ainsi que des éléments assurant son expression et le transport du produit de traduction dans la mitochondrie. Cette plante peut notamment appartenir à l'une des espèces suivantes : *B. napus*, *B. oleracea*, *B. campestris*, *B. nigra*, *B. juncea*, *B. hirta* et *B. carinata*.

La présence de la "séquence stérilité Ogura" est nécessaire et suffisante pour induire une absence totale de pollen en l'absence de gènes de restauration. La pollinisation de ces plantes est assurée normalement grâce à une bonne production de nectar.

La morphologie des organes femelles est normale et les fruits (siliques) formés contiennent un nombre normal de graines. La figure 5 montre la morphologie observée chez une plante normale témoin (z), une plante à morphologie aberrante possédant le génôme Ogura entier (z(6)) et des chloroplastes Brassica oleracea, une plante de chou portant des chloroplastes Brassica napus et des mitochondries mâle-stériles ayant des gènes Brassica napus (z(A)), et des plantes portant des chloroplastes Brassica oleracea et des mitochondries recombinées ne contenant plus les séquences indésirables (z(9) et z(17)). Les plantes ont les caractéristiques suivantes :

GENOTYPE	CHLOROPLASTES	MITOCHONDRIES
z	<i>B. oleracea</i>	<i>B. oleracea</i>
z(A)	<i>B. napus</i>	<i>B. napus/Ogura</i>
z(6)	<i>B. oleracea</i>	Ogura
z(9)	<i>B. oleracea</i>	<i>B. oleracea/Ogura</i>
z(17)	<i>B. oleracea</i>	<i>B. oleracea/Ogura</i>

Les génotypes z(A) et z(6) ne présentent pas un système de

stérilité mâle cytoplasmique approprié.

De telles plantes peuvent être obtenues par exemple par la technique de fusion de protoplastes ou par toutes autres techniques qui assurent une bonne recombinaison entre le génôme mitochondrial de l'espèce considérée et le génôme mitochondrial Ogura. Chez de telles plantes la fertilité est restaurée par un seul gène de restauration, appelé Rf1, provenant du radis, ce qui n'est pas le cas des plantes qui portent la totalité du génôme mitochondrial non approprié.

De telles plantes peuvent également être obtenues par reproduction sexuée naturelle ou artificielle.

Des plantes possédant un génôme mitochondrial selon l'invention peuvent également être obtenues par transfert de gène dans la mitochondrie.

Dans tous les cas, ces plantes possèdent un système CMS approprié à savoir :

- une stérilité mâle totale,
- une morphologie permettant une bonne pollinisation et une bonne production de graines comme illustré tableau 1 et tableau 2.

C'est pourquoi la présente invention concerne également un procédé de préparation de plantes hybrides, caractérisé en ce que l'on croise une plante présentant un caractère CMS approprié, comportant la séquence stérilité Ogura dans son génôme mitochondrial ou nucléaire avec une plante normale quand il s'agit d'une culture potagère ou fourragère, ou avec une plante apportant un gène restaurateur de fertilité, Rf1, lorsqu'il s'agit de récolter des graines. Elle concerne également une plante hybride obtenue par ce procédé.

D'une manière générale, les meilleures caractéristiques agronomiques sont obtenues pour des plantes mâle-stériles, possédant des chloroplastes de la même espèce que le noyau et des mitochondries présentant un système de stérilité mâle approprié.

Le tableau 1 représente la productivité d'une lignée de choux sur différents cytoplasmes, (les génotypes z9 ou z 17 sont appropriés). Le tableau 2 représente la productivité d'une lignée de colza sur différents cytoplasmes (les génotypes Fu 27, Fu 58 et Fu 85 sont appropriés).

TABLEAU I : PRODUCTIVITE DE LA LIGNEE z (CHOU A CHOUCROUTE) SUR DIFFERENTS CYTOPLASMES

<u>Cytoplasme</u>		<u>Génotypes</u>	<u>Récolte de semences</u>
<u>Chloroplaste</u>	<u>Mitochondries</u>		<u>Grammes/plantes</u>
B. oleracea (témoin fertile)	B. oleracea	(z)	53,1
B. napus	Ogura	(zC)	0
B. napus	Ogura/napus	(zA)	22,7
B. oleracea	Ogura	(z6)	9,3
Ogura	Ogura	(z0)	20,1
B. oleracea	Ogura/oleracea	<u>(z9 ou z17)</u>	91,8

TABLEAU 2 : PRODUCTIVITE DE LA LIGNEE DARMOR (COLZA D'HIVER) SUR DIFFERENTS CYTOPLASMES

* Rendement

• Colza d'hiver DARMOR mâle-fertile et mâle-stérile (Fu)

	<u>Rendement (% DARMOR)</u>	<u>Chloroplastes</u>	<u>Mitochondries</u>
DARMOR	100 (35 qx)	B. napus	B. napus
Fu 27	118	B. napus	B. napus/ogura
Fu 58	120	B. napus	B. napus/ogura
Fu 77	96	B. campestris	Ogura
Fu 85	114	B. napus	B. napus/ogura
Fu 118	103	B. napus	B. napus/ogura
BIENVENU	108		
JET NEUF	89		

TABLEAU 2 (suite)

Composantes du rendement (Clermont-Ferrand)

	NS	PIS	NGPS	NG	PIG	MST	HI	RDT	HT
DARMOR	7183	81,9	9,9	70028	4,31	1077	0,256	31,6	120
BIENVENU	7334	80,7	11,2	81841	3,88	1064	0,269	30,7	109
JET NEUF	7977	87,7	8,6	67291	4,98	1176	0,262	33,3	115
Fu 27 DARMOR	9292	82,8	11,6	106188	4,09	1337	0,293	42,2	122
Fu 58 DARMOR	8617	76,5	11,7	99947	3,65	1228	0,270	36,0	131
Fu 118 DARMOR*	8389	84,6	11,0	92428	4,11	1243	0,276	38,1	132

NS : Nombre de siliques/m² - PIS : Poids d'une silique (mg) - NGPS : Nombre de graines/silique
 NG : Nombre de graines/m² - PIG : Poids d'une graine (mg) - MST : Matière Sèche Totale (g/m²)
 HI : Indice de récolte (%) - RDT : Rendement (qx/ha) - HT : Hauteur (cm)

* Ces plantes présentent souvent des fruits (siliques) déformés.

La présente invention a également pour objet une sonde comportant une séquence d'au moins 10 bases, de préférence 15 bases, d'une séquence comprise entre les nucléotides numérotés 928 et 1569 sur la figure 1 ; ladite sonde peut être marquée par exemple au moyen d'une base radioactive ou par tout autre moyen, comme par exemple par fluorescence. Cette sonde peut être utilisée pour la mise en évidence de la stérilité mâle et peut être utilisée notamment dans la sélection de clones.

Des caractéristiques et avantages de la présente invention seront mieux mis en évidence dans les exemples suivants.

EXEMPLE 1 : MISE EN EVIDENCE DE LA SEQUENCE D'ADN RESPONSABLE DE LA STERILITE MALE CYTOPLASMIQUE OGURA.

1. Plante.

Par "cybride" on désigne des formes obtenues par la fusion de protoplastes isolés, suivie par la régénération de la plante entière. Ce mode d'obtention permet le mélange dans la cellule d'informations cytoplasmiques provenant des deux parents. Le cybride n° 13 a été obtenu parmi 820 plantes régénérées par fusions de protoplaste entre un cybride de B. Napus résistant à la triazine, Ogura cms (descendance du cybride 77 décrit dans Pelletier et al., 1983 et Chétrit et al., 1985) et la variété d'origine Brutor, sensible à la triazine, et fertile. Un test de résistance à la triazine (Ducruet et Gasquez, 1978) réalisé sur un échantillon de feuille de chaque régénérant a permis de déterminer le type de chloroplaste (chloroplastes résistants à la triazine provenant du parent 77 ou chloroplastes sensibles à la triazine provenant de la lignée Brutor). On a cultivé les plantes et observé le stade de floraison. Les plantes présentant des combinaisons non parentales (soit sensible/mâle stérile ou résistant/mâle fertile) ont été sélectionnées comme cybrides. Le cybride n° 13 était du type sensible/mâle stérile. Le cybride 1 était du type résistant/mâle fertile.

2. Isolement des acides nucléiques.

L'ADN total a été isolé à partir de feuilles provenant de plantes de 4 semaines selon la méthode décrite par Dellaporta (1983). L'ADN mitochondrial a été extrait de feuilles de plantes âgées de 8 semaines ainsi qu'il a été décrit par Vedel et Mathieu, 1982, avec les variantes suivantes :

les mitochondries n'ont pas été purifiées sur gradient de saccharose avant la lyse, et la lyse a été réalisée dans du sarcosyl à 4%, avec protéinase K 0,5 mg/ml (Boehringer Mannheim GmbH), dans du Tris pH 8, 50 mM, EDTA 20 mM. Après précipitation, l'ADN mitochondrial a été purifié par centrifugation en gradient bromure d'éthidium-chlorure de caesium (methode 1- Vedel et Mathieu 1982) dans des tubes de centrifugation en pollyallomère.

Les ARN totaux ont été isolés à partir de feuilles ou de bourgeons floraux selon Logemann et al., 1987.

Les ARN mitochondriaux ont été extraits de choux-fleurs âgés de 8 semaines, selon la technique de Stern et Newton, 1986.

3. Analyses par restriction de l'ADN mitochondrial et électrophorèse en gel d'agarose.

Elles ont été réalisées ainsi qu'il est décrit dans Pelletier et al., 1983. Les ARN totaux ou mitochondriaux ont été chargés sur des gels d'électrophorèse contenant du formaldéhyde tel qu'il a été décrit par Sambrook et al., 1989.

4. Hybridation.

Le transfert d'ADN ou d'ARN sur des filtres de nylon (Hybond-N, Amersham) a été mené par absorption capillaire respectivement avec 6xSSC ou 10xSSPE, suivant les instructions du fabricant. La préhybridation et l'hybridation ont été conduites selon Amersham, en

utilisant des sondes marquées par le système de marquage d'ADN multiamorce (Amersham) après purification sur colonnes de Sephadex G50 (Sambrook et al., 1989).

5 5. Clonage de l'ADN mitochondrial.

Deux banques génomiques de lignées cybride mâle stérile (13-7) et révertant (13-6) ont été construites dans un vecteur phage lambda EMBL3, cultivé sur la souche restrictive d'E. Coli Nm539 (Frischauf et al., 10 1983). On a obtenu environ $2,5 \times 10^4$ clones par μg d'ADN mitochondrial.

Les banques d'ADN mitochondrial ont été titrées et étalées afin d'isoler les plaques qui ont été transférées sur les filtres de nylon ainsi qu'il est décrit dans Sambrook et al., 1989. La sonde d'hybridation utilisée pour screener les deux banques d'ADN mitochondrial était préparée comme 15 suit : le fragment d'ADN mitochondrial spécifique de la cms a été élué en utilisant la procédure Gene cleanTM (BIO 101 INC.) à partir d'un produit de digestion d'ADN mitochondrial chargé sur un gel d'agarose préparatif. L'ADN élué a été ensuite marqué ainsi qu'il a été décrit.

20 L'extraction d'ADN Lambda, le sous-clonage du fragment NcoI 2,5 dans le site NcoI de pTrc99A (Amann et al., 1988) et les extractions d'ADN plasmidique ont été menés selon les protocoles de Sambrook et al., 1989. Les plasmides recombinants ont été introduits dans une souche d'E. Coli NM522 (Gough et Murray, 1983).

25

6. Etude génétique du cybride 13 et de ses descendants.

Dans la première génération de descendants obtenus par pollinisation du cybride 13 avec Brutor, composée de 13 plantes, 5 sont 30 totalement mâles stériles (y compris des plantes 13-2 et 13-7), une est mâle fertile (n° 13-6) et 7 sont pratiquement entièrement stériles avec quelques fleurs mâles fertiles.

35

La plante fertile 13-6 a été auto-pollinisée et croisée avec Brutor. Dans les deux cas on obtient uniquement des plantes fertiles (43 et 42 respectivement).

5 Dans les croisements entre la plante mâle stérile n° 13-7 et Brutor, 24 descendants sont entièrement stériles et 6 présentent quelques fleurs fertiles, résultat similaire à celui obtenu avec le cybride lui-même. La plante 13-2 a été croisée avec la lignée restauratrice RF qui est hétérozygote pour les gènes spécifiques de restauration pour la stérilité mâle Ogura (Chétrit et al., 1985). La descendance de ce croisement est
10 composée de 53 plantes mâles stériles, 37 plantes mâles fertiles et 9 plantes pratiquement entièrement stériles bien que présentant quelques fleurs fertiles. Ces résultats suggèrent que les plantes mâles stériles de la famille cybride 13 contiennent le déterminant Ogura cms, comme les autres cybrides étudiés auparavant avec un profil de restauration plus simple
15 (Chétrit et al., 1985).

A ce stade de l'étude, deux possibilités peuvent être envisagées: soit le cybride 13 contient un mélange de génomes mitochondriaux mâle fertiles et mâle-stériles, et l'on peut sélectionner davantage
20 pour purifier les deux phénotypes, soit le cybride 13 contient un génome mitochondrial recombiné de structure instable qui retourne à une configuration "fertile" plus stable, et il sera impossible de maintenir un phénotype mâle stérile homogène parmi les générations ultérieures.

25 Des plantes mâles stériles obtenues à partir de la descendance de la plante mâle stérile n° 13-7 ont été développées à la fois par bouture et par croisement sexué avec Brutor. Après un nombre variable de génération (1 à 5) par les deux méthodes, toutes les familles donnent des plantes fertiles. Par contre, les plantes entièrement fertiles ainsi obtenues
30 ne redonnent jamais de plantes stériles.

A la lumière de ces résultats, on peut considérer que la seconde explication proposée ci-dessus c'est à dire que le cybride 13 porte un génome mitochondrial instable qui perd le déterminant Ogura cms pendant le processus conduisant à une configuration "fertile", sans
5 possibilité de retour à un phénotype stérile, est la bonne.

7. Comparaison entre les ADN mitochondriaux de mâle-stériles et de révertants fertiles. Isolement d'un fragment spécifique des plantes mâle-stériles.

10 L'ADN mitochondrial a été extrait des feuilles de descendants 13-7 mâle-stériles et de révertants fertiles (descendants 13-6 où 13-7) et digéré avec plusieurs enzymes de restriction, afin de comparer leur profil de restriction. Les génomes mitochondriaux des deux types sont très
15 semblables puisqu'aucune différence ne peut être observée entre les profils de restriction des mitochondries mâle-stériles et révertants fertiles en utilisant différents enzymes. Cependant un fragment de restriction de 6,8 kb a été détecté dans le profil de restriction de l'ADN mitochondrial des plantes mâle-stériles digéré avec NruI et n'a jamais été observé dans les
20 profils des révertants fertiles correspondants.

Le fragment (appelé N6,8) a été élué d'un gel d'agarose, marqué, et utilisé comme sonde sur des profils de restriction d'ADN mitochondrial NruI : un signal important à 6,8 kb a été observé chez tous
25 les descendants mâle-stériles du cybride 13, alors qu'aucun fragment de cette taille n'a hybridé à la sonde dans les génomes de mitochondries de révertants fertiles. En outre, la sonde N6,8 hybride avec un fragment de 6,8 kb dans l'ADN mitochondrial Ogura digéré avec NruI, mais pas dans celui de B. Napus cv Brutor, montrant l'origine Ogura de ce fragment.

30 Une banque lambda contenant des extraits d'ADN mitochondrial provenant de plantes mâles stériles (13-7) a été testée avec le fragment marqué élué, et parmi 8 clones hybridant, 2 phages recombinants

ont été isolés, contenant le fragment N6,8 entier et des séquences adjacentes. Une carte de restriction détaillée de cette région a été obtenue. L'hybridation des profils de restriction de l'ADN mitochondrial provenant de descendants fertiles et stériles du cybride 13 avec N6,8
5 comme sonde a permis de limiter la région spécifique du génotype mâle stérile à un fragment NcoI de 2,5 kb.

Le fragment NcoI de 2,5 kb a été marqué et utilisé comme sonde vis-à-vis d'ADN mitochondrial provenant de descendants 13-7 et 13-6 digéré avec NcoI. Outre le signal à 2,5 kb qui est spécifique du profil mâle
10 stérile, plusieurs fragments NcoI hybrident à la fois dans les profils de révertant fertile et de mâle-stérile, ces fragments sont à 2,2, 10 et 14 kb. Un fragment NcoI de 2,7 kb hybride fortement dans le génome mitochondrial des descendants fertiles et pas dans celui des descendants stériles. L'analyse de ce profil d'hybridation conduit à la conclusion que le fragment
15 NcoI de 2,5 kb, bien que spécifique de l'ADN mitochondrial mâle-stérile, contient des séquences qui sont répétées ailleurs dans le génome mitochondrial (sur des fragments de 2,2, 10, et 14 kb après digestion par NcoI) et ces séquences répétées sont aussi présentes dans l'ADN mitochondrial de révertants fertiles outre le fragment spécifique de 2,7 kb.

20

Les ARN totaux sont extraits de feuilles ou de bourgeons de descendants de cybrides 13, ou de cybrides (provenant d'autres expériences de fusion) mâle stérile ou fertile et de lignée Brutor. Les Northern blots ont été réalisés et hybridés avec une sonde correspondant à l'insert du
25 clone Lambda contenant N6,8 décrit dans l'exemple 3. Un transcrit majeur de 1,4 kb a été détecté chez tous les cybrides mâle-stériles, y compris le cybride 13-7, alors qu'on n'a observé aucun transcrit de cette taille dans la lignée Brutor, ni dans les deux cybrides fertiles (différents de 13). Par ailleurs, des plantes fertiles présentent un transcrit de 1,1 kb hybridant
30 avec la sonde qui est absent ou présent à un niveau très bas dans tous les cybrides mâle-stériles testés. Plusieurs transcrits communs à tous les échantillons hybrident faiblement avec la sonde, à cause de la taille

35

importante de l'insert marqué. On a vérifié que les transcrits mitochondriaux peuvent être détectés dans des échantillons d'ARN totaux par hybridation du même Northern blot avec un fragment d'ADN contenant la séquence du gène atpa.

5 Le même transcrit spécifique de 1,4 a été trouvé dans les ARN mitochondriaux Ogura extraits de choux-fleurs, en utilisant le fragment NcoI2,5 comme sonde. Les limites exactes de ce transcrit ont été déterminées en utilisant comme sonde des sous clones du fragment NcoI 2,5.

10

8. Etude du cybride 1 et de ses descendants

Le cybride 1 était mâle fertile. Dans sa descendance, la plante 1.12 était fertile et la plante 1.18 stérile. La plante 1.12 a donné dans sa
15 descendance des plantes stériles (S_3) et des plantes fertiles (RF_3). La plante 1.18 a donné des plantes stériles (S_2) et un rameau fertile (RF_2). Les plantes S_2 et S_3 sont restaurées par le même gène nucléaire de restauration de la fertilité pollinique que le cybride 13 stérile.

20 L'ADN mitochondrial des plantes S_2 et S_3 , par hybridation avec le fragment NcoI de 2,5 kb marqué, ne donne pas un signal à 2,5 kb sur une digestion NcoI, ni un signal à 6,8 kb sur une digestion NruI.

De même l'hybridation sur les ARN totaux (Northern) avec une sonde correspondant à la séquence ORFB ne donne pas un signal à 1,4 kb comme chez le cybride 13 stérile. Par contre, une sonde correspondant à la
25 séquence comprise entre les nucléotides 928 et 1569 de la figure 1 donne un signal en Northern à environ 1,3 kb. Ce signal est absent sur l'ARN des plantes RF_1 , RF_2 , RF_3 ou Brutor. De même il est possible d'utiliser cette séquence (928-1569) comme sonde en dot blot d'ARN totaux et dans ce cas, seules, et toutes, les plantes mâle-stériles donnent un signal.

30 Ces résultats indiquent que les plantes S_2 et S_3 , bien que mâle-stériles, n'ont pas conservé la séquence nucléotidique, décrite dans la figure 1, dans sa conformation originale et ils démontrent que, dans cette

35

séquence, la partie comprise entre les nucléotides 928 et 1569 est celle qui porte le déterminant spécifique "stérilité Ogura", qui rend les plantes mâle-stériles, lorsque cette séquence est transcrite.

Cette séquence n'a pas d'homologie significative avec les
5 séquences présentes dans les banques de données.

**EXEMPLE 2 : MISE EN EVIDENCE DE SEQUENCES INDESIRABLES DANS
LE GENOME MITOCHONDRIAL OGURA.**

10 Une collection de cybrides a été obtenue dans l'espèce *B. napus* par fusion de protoplastes entre un colza porteur du cytoplasme Ogura et un colza normal. Le premier est mâle-stérile et déficient chlorophyllien à basse température, le second est normalement vert et fertile. Les cybrides ont été triés parmi les plantes régénérées et l'on a
15 retenu ceux qui étaient mâle-stériles et normalement verts.

De la même manière une collection de cybrides a été obtenue dans l'espèce *B. oleracea* par fusion de protoplastes entre un chou porteur du cytoplasme Ogura et un chou normal. On a retenu parmi les plantes régénérées les cybrides qui étaient mâle-stériles et normalement verts.

20 Ces cybrides ont été croisés avec différentes variétés, de colza dans le premier cas, de chou dans le second. Les croisements ont été répétés à chaque génération avec les mêmes variétés de façon à obtenir un génotype défini, proche de celui de la variété récurrente.

Ces différentes variétés, converties ainsi sur les cytoplasmes
25 de différents cybrides ont été soumises à des essais agronomiques pour mesurer la production de graines, qui dépend de plusieurs facteurs : une production de nectar suffisante pour assurer une pollinisation par les insectes, une morphologie florale normale pour que cette pollinisation soit efficace et que les fruits se développent normalement.

30 La collection de cybrides a ainsi pu être divisée en deux lots :
- un lot de cybrides présentant une stérilité mâle appropriée à la production commerciale de semences.

- un lot de cybrides ne présentant pas toutes les caractéristiques favorables à une bonne production commerciale de semences.

Au premier lot appartiennent par exemple les cybrides de colza n° 27, 58, 85 et les cybrides de chou n° 9, 17, 21, 24, 27c.

5 Au deuxième lot appartiennent par exemples les cybrides de colza n° 23s, 77, 118 et les cybrides de chou n° 1, 6, 14.

Les ADN totaux de ces cybrides ont été soumis à des digestions enzymatique par Sall, NcoI, NruI, BglI, PstI, KpnI. Les Southern blots obtenus ont été hybridés avec différentes sondes mitochondriales
10 Atpa, Cob, CoxI, Atp6, 26S, 18S, et deux fragments du génôme Ogura de 2,5 kb issu d'une digestion NcoI et de 19,4 kb issu d'une digestion NruI.

Les deux lots de cybrides se distinguent en ce que :

- 15 a) les n° 23s, 77, 11s, chez le colza et 1, 6, 11, chez le chou possèdent la région du génôme Ogura qui entoure le gène coxI reconnaissable par des fragments BglI de 10.7 kb ou NruI de 11 kb et la région du génôme Ogura qui entoure un des gènes de l'ARN de transfert formylméthionine reconnaissable par des fragments Sall de 5,1 kb ou NruI de 15 kb.
- 20 b) les n° 27, 58, 85 chez le colza et 9, 17, 21, 24, 27c chez le chou ne possèdent pas les régions correspondantes qui ont été remplacées, du fait de recombinaisons entre les génômes des deux parents qui ont été fusionnés, par des régions analogues du génôme mitochondrial de colza chez les n° 27, 58, 85, de chou chez les n° 9, 17, 21, 24, 27c.

On en déduit que les deux régions en question du génôme Ogura sont indésirables si l'on veut avoir un système de stérilité mâle approprié à la
25 production commerciale de semences.

EXEMPLE 3

30 Cet exemple illustre l'intérêt de la connaissance des séquences "stérilité mâle Ogura" et des séquences indésirables pour effectuer un tri immédiat des cybrides obtenus sans avoir à attendre plusieurs années de rétrocroisement et des tests agronomiques.

On fusionne des protoplastes d'une plante de Brassica portant le cytoplasme Ogura avec des protoplastes de l'espèce Brassica considérée. Les colonies issues de fusion sont cultivées in vitro et mises à régénérer sur un milieu qui favorise la formation de bourgeons (voir Pelletier et al. 1983).

A partir d'un gramme de matière fraîche qu'il s'agisse d'un cal ou d'un fragment de la plantule régénérée, il est possible par les techniques décrites précédemment d'isoler l'ADN total. Après digestion par Sall, l'hybridation de type Southern avec la sonde comprise entre les nucléotides n° 389 et 1199 (voir figure 1) ne doit donner un signal que pour une taille de 4,4 kb (ne doit pas donner de signal à 5,1 kb). De même après digestion par NruI et hybridation avec une sonde portant le gène coxI, on doit obtenir un signal pour une taille différente de 11 kb.

Ces hybridations permettent de prédire qu'on a bien une plante qui sera mâle stérile et qui sera appropriée à la production commerciale de semence.

EXEMPLE 4

Cet exemple est une variante de l'exemple 3 ou l'on imagine qu'au lieu de réaliser des fusions de protoplastes, on réalise un croisement sexué entre les deux parents dans des conditions particulières ou avec des génotypes particuliers de telle sorte que, contrairement aux processus connus de la fécondation chez les végétaux, il y a mélange des cytoplasmes de l'oosphère et du tube pollinique ou du gamète mâle. Si de tels procédés étaient décrits, on pourrait de la même manière effectuer un tri précoce, sur de jeunes plantes issues de ces fécondations artificielles en utilisant les mêmes sondes et les mêmes critères que dans l'exemple 3.

30

35

EXEMPLE 5

Cet exemple illustre l'intérêt de la connaissance de la séquence stérilité Ogura dans un type de manipulation génétique qui a déjà
5 été décrit chez la levure (Johnston et al. 1988).

A partir d'une plante de Brassica normale on bombarde des méristèmes ou bien des cellules in vitro avec des microparticules recouvertes d'ADN portant la séquence stérilité Ogura. Les plantes
10 obtenues dans la descendance des méristèmes traités ou des plantules régénérées seront mâle-stériles cytoplasmiques si l'ADN a pu pénétrer dans les mitochondries et s'intégrer au génôme de ces organites. On évitera ainsi les problèmes posés par les séquences indésirables, qu'il s'agisse des chloroplastes du radis Ogura ou des séquences ainsi définies du génôme mitochondrial Ogura.

15

EXEMPLE 6

Cet exemple illustre l'intérêt de la connaissance de la séquence "stérilité Ogura" dans la construction par génie génétique d'une
20 stérilité mâle nucléaire, à hérédité mendélienne et non plus cytoplasmique.

A partir de la séquence d'ADN mitochondrial délimitée par les nucléotides 928 et 1569, on peut construire un gène chimérique qui sera après transformation génétique de cellules de Brassica ou d'un autre genre, transcrit dans le noyau des cellules des plantes transformées obtenues. Si le
25 gène chimérique contient une préséquence qui permet l'importation dans la mitochondrie de son produit de traduction en protéine, ces transformants seront mâle-stériles, et ce caractère se comportera comme un caractère mendélien dominant.

30

35

R E F E R E N C E S

- 5 Amann E, Ochs B, Abel K-J (1988) *Gene* 69:301-315
Bannerot H, Bouldard L, Cauderon Y, Tempé J (1974) *Proc Eucarpia Meeting Cruciferae* 25:52-54
Bannerot H, Bouldard L, Chupeau Y (1977) *Eucarpia Cruciferae News!* 2-16
10 Chétrit P, Mathieu C, Vedel F, Pelletier G, Primard C (1985) *Theor Appl Genet* 69:361-366
Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) *Plant Mol Biol Rep* 1:19-21
Ducruet JM and Gasquez J (1978) *Chemosphere* 8:691-696
Frishauf AM, Lehrach H, Poutska A, Murray N (1983) *J Mol Biol* 170:827-842
15 Gough J and Murray N (1983) *J Mol Biol* 166:1-19
Hiesel R, Shobel W, Schuster W, Brennicke A (1987) *EMBO J* 6:29-34
Johnston SA, Anziano PQ, Shark K, Sanford JC, Butow RA (1988) *Science* 240:1538-1541
Logemann J, Schell J, Willmitzer L (1987) *Analytical Biochem* 163:16-20
20 Ogura H (1968 *Mem Fac Agric Kagoshima Univ* 6:39-78
Pelletier G, Primard C, Vedel F, Chétrit P, Rémy R, Rousselle P, Renard M (1983) *Mol Gen Genet* 191:244-250
Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
25 Stern DB and Newton KJ (1986) *Methods Enzymol* 118:488-496
Vedel F and Mathieu C (1982) *Anal Biochem* 127:1-8

30

35

REVENDECATIONS

- 1) Séquence d'ADN stérilité Ogura, caractérisée en ce que :
- 5 a) elle est portée par une séquence d'ADN délimitée par les nucléotides numérotés 928 et 2273 sur la figure 1, ou
- b) elle présente au moins 50 % d'homologie avec ladite séquence mentionnée en a),
- et confère, lorsqu'elle est présente dans le génôme mitochondrial ou nucléaire d'une plante, une stérilité mâle cytoplasmique à ladite plante.
- 10 2) Séquence d'ADN selon la revendication 1, caractérisée en ce que elle est portée par la séquence délimitée par les nucléotides 928 et 1569 de la figure 1, ou en ce qu'elle présente au moins 50 % d'homologie avec ladite séquence
- et en ce qu'elle est transcrite en ARN dans les mitochondries de plantes
- 15 mâle-stériles.
- 3) Génôme nucléaire ou mitochondrial végétal recombiné, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence d'ADN stérilité Ogura,
- a) qui est portée par une séquence délimitée par les nucléotides numérotés 928 et 1569 sur la figure 1, ou
- 20 b) qui présente au moins 50 % d'homologie avec ladite séquence mentionnée en a),
- et confère lorsqu'elle est présente dans le cytoplasme d'une plante, une stérilité mâle cytoplasmique à ladite plante.
- 4) Génôme nucléaire ou mitochondrial végétal recombiné selon
- 25 la revendication 3, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence d'ADN stérilité Ogura, qui est portée par une séquence délimitée par les nucléotides numérotés 928 et 1569 sur la figure 1, ou
- qui présente au moins 50 % d'homologie avec ladite séquence.
- 5) Génôme nucléaire ou mitochondrial selon l'une des
- 30 revendications 3 et 4, caractérisé en ce que ledit génôme recombiné ne comporte pas tout ou partie de l'un et/ou l'autre des deux fragments du génôme Ogura :

- portant l'un des deux gènes de l'ARN de transfert formylméthionine servant à l'initiation de la traduction,
- portant le gène *cox1*, codant pour la sous unité n° 1 de la cytochrome oxydase,

5 ou dans lequel lesdits fragments sont inactifs.

6) Génôme nucléaire ou mitochondrial selon l'une des revendications 3 à 5, caractérisé en ce qu'il est dépourvu d'une partie de la séquence qui est portée par un fragment de 10,7 kb, après digestion par BglI, et un fragment de 11 kb après digestion par NruI, révélés par
10 hybridation avec une sonde *cox1*.

7) Génôme nucléaire ou mitochondrial selon l'une des revendications 3 à 6, caractérisé en ce qu'il est dépourvu d'une partie de la séquence qui après digestion par NruI donne un fragment de 15 kb, après digestion par Sall donne un fragment de 5,1 kb et après digestion par BglI
15 donne un fragment de 18,5 kb, et qui est révélé par hybridation avec une sonde correspondant à la séquence comprise entre les bases 389 à 1199 de la séquence représentée sur la figure 1.

8) Génome nucléaire ou mitochondrial selon l'une des revendications 3 à 7, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence qui
20 après digestion par NcoI donne un fragment de 2,5 kb, après digestion par NruI donne un fragment de 6,8 kb, et après digestion par Sall donne un fragment de 4,4 kb.

9) Génôme nucléaire, caractérisé en ce qu'il comporte outre la séquence d'ADN selon l'une des revendications 1 à 8, une préséquence
25 permettant l'importation dans les mitochondries du produit de traduction de ladite séquence.

10) Génôme selon l'une des revendications 3 à 8, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un génôme mitochondrial

11) Mitochondrie caractérisée en ce qu'elle comporte un
30 génôme selon la revendication 10.

12) Cytoplasme, caractérisé en ce qu'il comporte un génôme mitochondrial selon la revendication 10, et en ce qu'il comporte des chloroplastes de la même espèce que le génôme nucléaire ou d'une autre espèce mais compatibles avec ce génôme nucléaire.
35

13) Plante appartenant au genre *Brassica*, caractérisée en ce qu'elle contient des chloroplastes de *Brassica* compatibles avec le génôme nucléaire de ladite plante et des mitochondries selon la revendication 11.

5 14) Plante appartenant au genre *Brassica*, caractérisée en ce que son génôme nucléaire comprend un génôme selon la revendication 9, ainsi que des éléments assurant son expression et le transport du produit de traduction dans la mitochondrie.

15) Plante selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle appartient à l'espèce *Brassica napus*.

10 16) Plante selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle appartient à l'espèce *Brassica oleracea*.

17) Plante selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle appartient à l'espèce *Brassica campestris*.

15 18) Plante selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle appartient à l'espèce *Brassica juncea*.

19) Plante selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle appartient à l'espèce *Brassica nigra*.

20) Plante selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle appartient à l'espèce *Brassica hirta*.

20 21) Plante selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle appartient à l'espèce *Brassica carinata*.

22) Plante selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle appartient à l'une des espèces suivantes : *B. napus*, *B. oleracea*, *B. campestris*, *B. nigra*, *B. juncea*, *B. hirta* et *B. carinata*.

25 23) Plante selon l'une des revendications 13 à 22, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par fusion de protoplastes.

24) Plante selon l'une des revendications 13 à 22, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par reproduction sexuée.

30 25) Plante selon l'une des revendications 13 à 21, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par transfert de gène dans la mitochondrie.

26) Procédé de préparation de plantes hybrides, caractérisé en ce que l'on croise une plante présentant le caractère cytoplasme mâle stérile selon l'une des revendications 13 à 25, avec une plante de la même espèce, possédant éventuellement un gène restaurateur de fertilité Rf1.

5 27) Plante hybride obtenue par le procédé selon la revendication 26.

28) Sonde d'ADN, caractérisée en ce qu'elle comporte une séquence d'au moins 10 bases de la séquence comprise entre les nucléotides numérotés 928 et 1569 représentés sur la figure 1, marquée par un moyen
10 radioactif ou non.

15

20

25

30

35

REVENDICATIONS MODIFIEES

[reçues par le Bureau international
le 11 mars 1992 (11.03.92);

revendication 28 modifiée; autres revendications inchangées (1 page)]

26) Procédé de préparation de plantes hybrides, caractérisé en ce que l'on croise une plante présentant le caractère cytoplasme mâle stérile selon l'une des revendications 13 à 25, avec une plante de la même espèce, possédant éventuellement un gène restaurateur de fertilité Rfl.

5 27) Plante hybride obtenue par le procédé selon la revendication 26.

28) Sonde d'acides nucléiques, caractérisée en ce qu'elle comporte une séquence d'au moins 10 bases de la séquence comprise entre les nucléotides numérotés 928 et 1569 représentés sur la figure 1, et
10 responsable du caractère cytoplasme mâle stérile, marquée par un moyen radioactif ou non.

15

20

25

30

35

1/14

```

      N
      B l
      sDNSa      D      H      T      C      T
      asctI      d      n      pll      li      I
      JaoyI      e      f      Eey      uJ      -
      IIIII      I      I      III      II      2
      ///
      CCATGGACAATAATCTTAGTCGGAGTCAAATTCCTTACCTTTCCACCCAAAGCTGAACAT
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      GGTACCTGTTATTAGAATCAGCCTCAGTTTAAGGAATGGAAAGGTGGGTTTCGACTTGTA

      S
      BB Na      B      E p l
      asDlu      A sT      c u a
      mtpa3      l ta      o l I
      HYnIA      w Bq      B 0 I
      IIIVI      I II      I I I
      / // /

      ATCCGCACAGATATTCATTTTTTTTATTGAGGATCCATTTTCGAACTGAACTACTCATG
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
      TAGGCGTGTCTATAAGGTAAAAAAATAACTCCTAGGTAAAAGCTTGACTTGATGAGTAC

      T
      t
      h
      l
      C C      F      N
      BAvMNAvS      M u      l
      bliahlif      n 4      a
      vuJeeuJe      l H      I
      IIIIIIIII      I I      V
      /// //

      CTTAGGCAAAACAAGCAAGGGAGTTGTTAATAAGGAGCTAGCTACAGTGCTGCGGAGGGT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
      GAATCCGTTTTGTTTCGTTCCCTCAACAATTATTCCTCGATCGATGTCACGACGCCTCCCA

      S
      t      NC S n C      F
      y      M      lvmNc u Av      B
      S      s      aiscr 4 li      b
      J      e      IJpiF H uJ      v
      I      I      VIIII I II      I
      /      /      /

      TCCGTGCTTATTAAGGAGCCGGGCAGCTACGCAACACTTCCTTGCAACTCATACCTACTA
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
      AGGCACGAATAATTCCTCGGCCCGTCGATGCGTTGTGAAGGAACGTTGAGTATGGATGAT

```

FIG.1

FIG. 1

		F			
		Cn		E	MBS
B	M	AvuBF	M	C	RasnRS
b	s	li4sa	n	O	seaasp
v	e	uJHmu	l	N	aIABal
I	I	IIIII	I	I	IIIII
		//			//

ACAAACTGTTTACTCTTTTTTAAGAGTTAGCTGCATTCTGCGGGAGGTACGTACGCAAT
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
TGTTTGACAAATGAGAAAAAATTCTCAATCGACGTAAGGACGCCCTCCATGCATGCGTTA

			B		
	E		s		
	F C		p		N
	n o	1M		B	1
M	u P	2aB	M	s	a
w	4 1	8eb	w	p	i
o	H 5	6Iv	o	M	i
I	I I	III	I	I	i

301 CAAAGCAGCAGGGCACGTTTCGCAACACCTGCTTCAACTTCATGCACATTAGCAACAAGAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
GTTTCGTCGTCCCGTGCAAGCGTTGTGGACGAAGTTGAAGTACGTGTAATCGTTGTTCTA

	F F			E
	CnBn C			CBS
M B	AvusuPAvS	B	S	osc
n b	li4p4slif	b	f	Rar
l v	uJHCHtuJe	v	e	IJF
I I	IIIIIIII	I	I	III
	// //			

361 TGGGTAGTTGATTGTTGGGAGGATAGCTGCAGCTCCCTACGGGAGTGAACCTACAGTTCCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
ACCCATCAACTAACAAACCCTCCTATCGACGTCGAGGGATGCCCTCACTTGATGTCAAGGT

B							
s							
p	S	H	C				
1H	Ba	Ca	f	C			M
2g	su	ve	MM	v	F	HT	E
8i	p9	iI	lms	i	a	hh	a
6A	C6	JT	Ol	p	J	u	aa
rr	rr	rr	rr	r		r	r
/	/	/	/	/	/	/	/

GGGGGAGCACAGCAAGGCCAATACCGGCTGTGAGGCGGTAGCGGGAAGAGATGTATGG
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
CCCCCTCGTGTGCTTCCCGGTTATGGCCGACACTCCGCGCATCGCCCTTCTCTACATACC

C			S		
Av	M		Ba	B	
li	s	A	su D	sFS	M
uJ	e	l	a3 p	aot	n
II	I	w	BA n	Jky	l
/		I	II I	III	I
				//	

481 TAAGGGATAGCTGTTTAACCATTTGTAATGGAATGGGATGTTGATCCTCCTTGGAATAAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
ATTCCCTATCGACAAATTGGTAACATTACCTTACCCTACAAC TAGGAGGAACCTTATTA

3 / 14

FIG. 1

[illegible]

4/14

FIG.1

						H		N
			M	T	i		C B	l
F	M	M	b	s	n		v s	a
a	n	n	o	p	c		i p	I
u	l	l	I	E	I		J H	I
I	I	I	I	I	I		I I	I

CGGGGAAGAAGCGGGGTAGAGGAATTGGTCAACTCATCAGGCTCATGACCTGAAGATTAC
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
 GCCCCTTCTTCGCCCCATCTCCTTAACCAGTTGAGTAGTCCGAGTACTGGACTTCTAATG

		E						
M		C					S	
b		o	F	S	F		f	T
o		5	i	p	a		a	a
I		7	n	i	u		N	q
I		I	I	I	I		I	I

AGGTTCAAATCCTGTCCCCGACCGTAGTTTCATTCTGCATCACTCTCCCTGTCGTTATC
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
 TCCAAGTTTAGGACAGGGGCGTGGCATCAAAGTAAGACGTAGTGAGAGGGACAGCAATAG

			H X		M TE	
		G	GCa m		aBsc	M
		d	EdveMa		ecpo	b S
		i	aiiIcI		Ie45	o p
		I	eIJIrI		If57	I i
		I	IIIIII		IIII	I I

/ / /

GACATCGCAAGGTTTTTGAACCGGCCGAAACGGGAAGTGACAATACCGCTTTTCTTCAGC
 961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
 CTGTAGCGTTCCAAAACTTTGCCGGCTTTGCCCTTCACTGTTATGGCGAAAAGAAGTCG

	B	T
	sT	s
	ta	p
	Bq	E
	II	I

/

ATATAAATGCAATGATTACCTTTTTCGAAAAATTGTCCACTTTTTGTGCATAATCTCACTC
 1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
 TATATTTACGTTACTAATGGAAAAAGCTTTTTAACAGGTGAAAAACAGTATTAGAGTGAG

		S H
	C	aCa
	Av	uve
	li	9II
	uJ	6JI
	II	III

/ /

CTACTGAATGTAAAGTTAGTGTAATAAGTTTCTTTCTTTTAGCTTTTTTACTAATGGCCC
 1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
 GATGACTTACATTTCAATCACATTATTCAAAGAAAGAAAATCGAAAAATGATTACCGGG

5 / 14

[illegible]

FIG_1

6/14

FIG. 1

T
 a
 q
 I
 I
 -
 1

T
 Ms
 fp
 eE
 II
 /

1441 -----+-----+-----+-----+-----+ 1500
 AGAAAATAATGCTTTGTGAACCCAATTGCTTTGACAAAAATAAAGAAAGAAGCAAAATCT
 TCTTTTATTACGAAACACTTGGGTTAACGAAACTGTTTTTATTTCTTTCTTCGTTTTAGA

S
 T BB a M
 s E gsDu b
 p a ltp3 o
 E r IYnA I
 I I IIII I

N
 l
 a X
 I c
 I m
 I I

/ /

1501 -----+-----+-----+-----+-----+ 1560
 CATTCAATTTGAAATAGAAGAGATCTCTATGCCCCCTGTTCTTGGTTTTCTCCCATGCTT
 GTAAGTTAACTTTATCTTCTCTAGAGATACGGGGGACAAGAACCAAAAGAGGGTACTGAA

H
 i
 n
 c
 I
 I

M
 bS
 of
 Ie
 II

C
 v
 i
 J
 I

TTGTTGGTCAACAACCAACCACAACCTTTCTATAGTTCTTCACTACTCCTAGAGGCTTGAC

1561 -----+-----+-----+-----+-----+ 1620
 AACAACCAGTTGTTGGTTGGTGTGAAAGATATCAAGAAGTGATGAGGATCTCCGAAC TG

C H T N
 AvM iT G sAM l
 lin nf s pss I
 uJl fl u Eee I
 III II I III I

// /

1621 -----+-----+-----+-----+-----+ 1680
 GGAGTGAAGCTGTCTGGAGGGAATCATTTTGTGAAATCAATTAATCTAATCATGCCTCA
 CCTCACTTCGACAGACCTCCCTTAGTAAAACAACCTTTAGTTAATTAGATTAGTACGGAGT

T M T M
 BM s b s b
 sn p o p o
 r1 E I E I
 II I I I I

/

1681 -----+-----+-----+-----+-----+ 1740
 ACTGGATAAATTCACCTATTTTTTACAATTCTTCTGGTTATGCCTTTTCTTCTTTACTTT
 TGACCTATTTAAGTGAATAAAAAGTGTTAAGAAGACCAATACGGAAAAGAAGAAATGAAA

7/14

FIG. 1

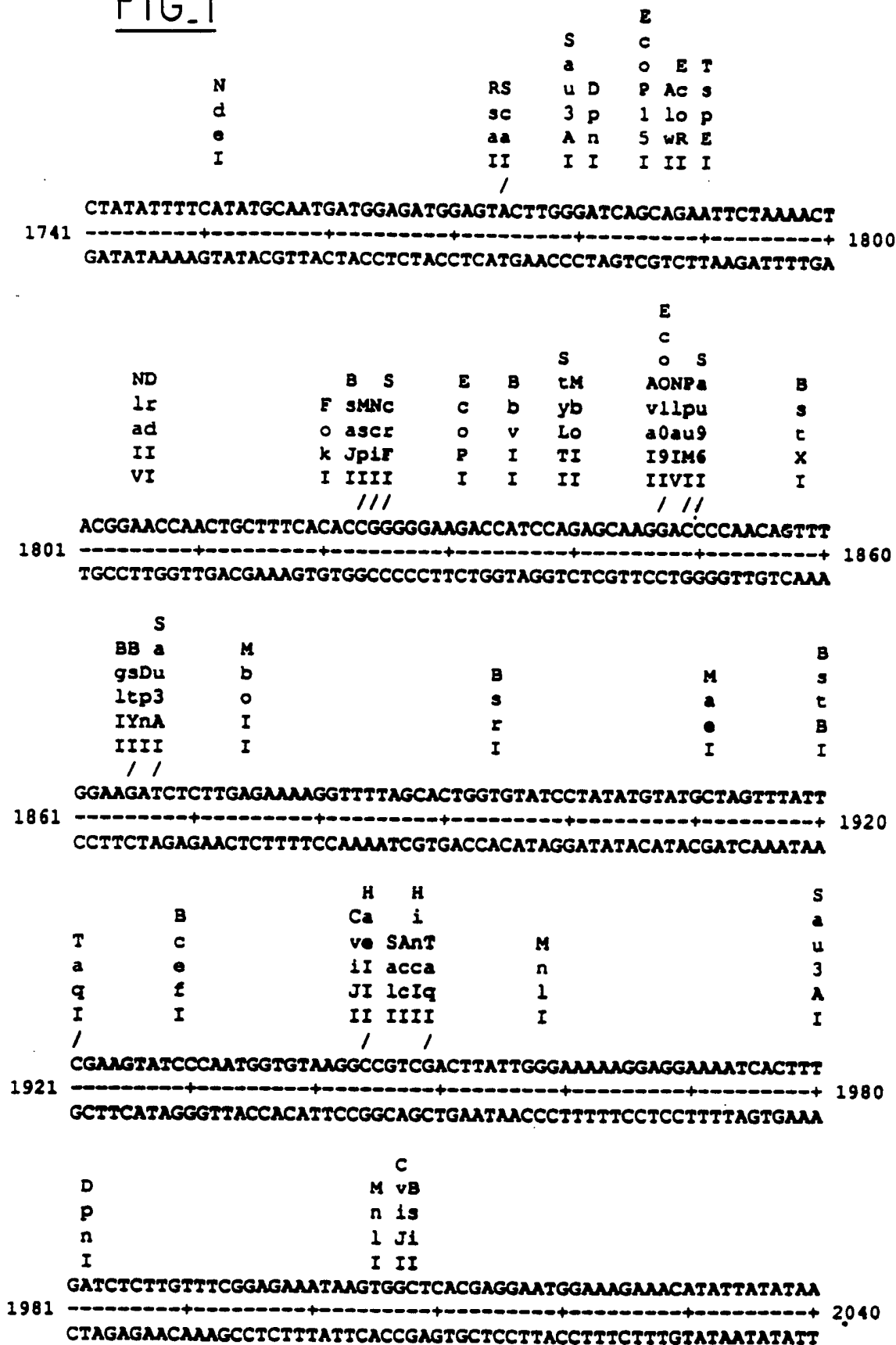


FIG. 1

8/14

T M B u D A S
 a n s 3 p l p
 q l r A n w E
 I I I I I I I

TATATCGAAGTCCTCTCCTTCAAATACTGGAAGGTGGATCACTTGTAGGAATTGTAGGAA
 2041 -----+-----+-----+-----+-----+ 2100
 ATATAGCTTCAGGAGAGGAAGTTTATGACCTTCCACCTAGTGAACATCCTTAACATCCTT

N N H
 l l BC a H
 a XR EaBsvHeSM iT S
 I cs aIaaiatw nf f
 I ma eIlJJeIyo fi e
 I II IIIIIIII II I

TGACATAATGCTAATCCATGTTGTACATGGCCAAGGAAGCATAAAATGATTCTTTCATTC
 2101 -----+-----+-----+-----+-----+ 2160
 ACTGTATTACGATTAGGTACAACATGTACCGGTTTCCTTCGTATTTTACTAAGAAAGTAAG

E
 C
 O
 R
 l
 2 B
 4F MT s
 /a nh p
 3u la C
 II II I
 / /

E M
 c n
 o l
 N l
 I I

TATAGATACCTCTGGTAGGTAAAGCACTCTACTGTGCTTTTATTGAAAGTTCCTCATCGCGG
 2161 -----+-----+-----+-----+-----+ 2220
 ATATCTATGGAGACCATCCATTTTCGTGAGATGACACGAATAACTTTCAAGGGTAGCGCC

B C H E
 s T T P v i M CM
 p h a l i n l os
 C a q e J f y Dp
 I I I I I I I I I

GGGCGAGGATACTTGCCCTTCGCGGTTTCGACTTTCTTTTCAGGCTTGACTCATTATTTTCC
 2221 -----+-----+-----+-----+-----+ 2280
 CCCGCTCCTATGAACGGAAGCGCCAAGCTGAAAGAAAAGTCCGAACTGAGTAATAAAAGG

B
 s
 P
 S
 Aa S CB1H H C
 vu M fAva2gS D iT v
 a9 n alin8is d nf i
 I6 l NuJI6At e fi J
 II I IIIIIIII I II I
 / / ///

GGTCTCTCACACCCCTTTAGAGCTCTTTATGATGCCCACTGAGTAAGATTTCGGGGGCTT
 2281 -----+-----+-----+-----+-----+ 2340
 CCAGGAGAGTGTGGGGAAATCTCGAGAAATACTACGGGTGACTCATTCTAAGCCCCCGAA

9/14

FIG. 1

N

S	B	C		B sS	ENM	B	M
MNc	H s	Av	F	sDpaST	slb	st E	a EM
scr	h p	li	a	asBcph	pao	ma a	e an
piF	a C	uJ	u	JaIIia	3II	Aq r	I rl
III	I I	II	I	IIIIII	IVI	II I	I II
//	/	/	/	/	/	/	/

CCCGGCGCAGAAGCTCATTCTGAACCGCGGGAACCTTCGTCTCTTCGACACAAACGTTTT
 2341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400
 GGGCCGCGTCTTCGAGTAAGACTTGGCGCCCTTGGAAGCAGAGAAGCTGTGTTTGCAAAA

S

C	M	BBB	N a
v	M b	A	sasDIHu
i	n o	l	amtpap3
J	l I	w	BHYnIhA
I	I I	I	IIIIVII
/	/	/	/

ATGAAGAGGCTGATGGTGTGAGGATCC
 2401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2428
 TACTTCTCCGACTACCACTACTCCTAGG

Enzymes qui coupent:

AccI	AflIII	AluI	AlwI	AlwNI	AseI	AvaI	AvaII
BalI	BamHI	BanII	BbvI	BbvII	BceI	BglII	BpuI0I
BsaI	BsaAI	BsaBI	BsaJI	BsiI	BsmI	BsmAI	BspI286I
BspCI	BspHI	BspMI	BsrI	BstBI	BstXI	BstYI	CfrI0I
CviJI	DdeI	DpnI	DrdII	DsaI	EaeI	EarI	Eco57I
EcoBI	EcoDI	EcoNI	EcoO109I	EcoPI	EcoP15I	EcoRI	EcoRII
EcoRI24/3I	EspI	Esp3I	FauI	FinI	Fnu4HI	FokI	GdiII
GsuI	HaeI	HaeII	HaeIII	HgiAI	HhaI	HincII	HinfI
HphI	MaeI	MaeII	MaeIII	MboII	McrI	MfeI	MlyI
MmeI	MnlI	MseI	MspI	MwoI	NciI	NcoI	NdeI
NheI	NlaIII	NlaIV	NruI	NspBII	PleI	PmlI	PpuMI
PstI	RsaI	SacII	SalI	Sau96I	Sau3AI	ScaI	ScrFI
SfaNI	SfeI	SnaBI	SpeI	SpiI	SplI	SstI	StyI
StyLTI	StySJI	TaqI	TaqII-1	TaqII-2	TfiI	ThaI	Tsp45I
TspEI	TthIII	XbaI	XcmI	XmaIII	XmnI		

Enzymes ne coupant pas :

AatII	AflII	AgeI	AhaII	Apal	ApalI	AvrII	BanI
BcgI	BclI	BglI	BspGI	BspMII	BssHII	BstEII	Bsu36I
CfrAI	Clal	DraI	DraIII	DrdI	EciI	Eco47III	EcoAI
EcoDXXI	EcoEI	EcoKI	EcoRI24I	EcoRV	FseI	FspI	HgaI
HgiEII	HindIII	HinfIII	HpaI	KpnI	MluI	NaeI	NarI
NotI	NsiI	NspI	PflMI	PshAI	PvuI	PvuII	RleAI
RsrII	SfiI	SgrAI	SmaI	SnaI	SphI	SspI	StuI
StySBI	StySPI	StySQI	TthIIII	UbaI105I	UbaI108I	XhoI	

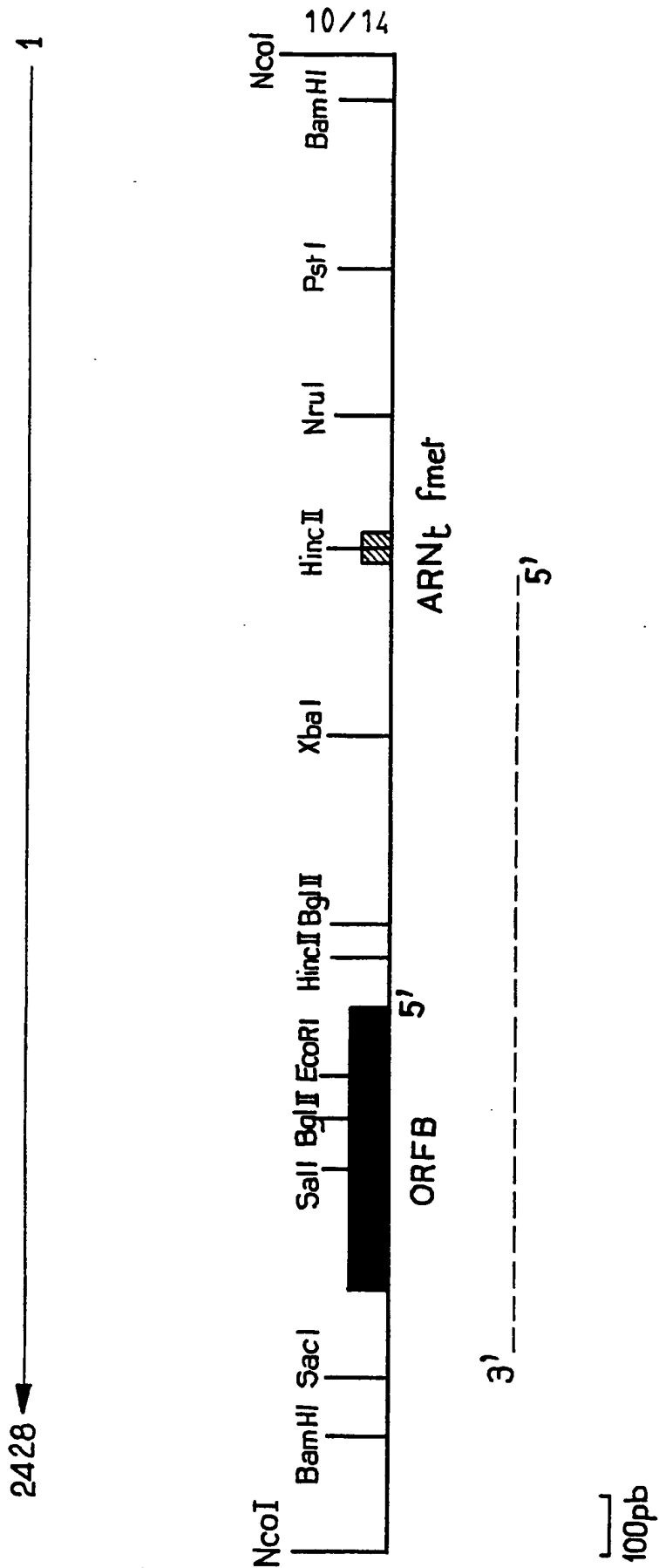
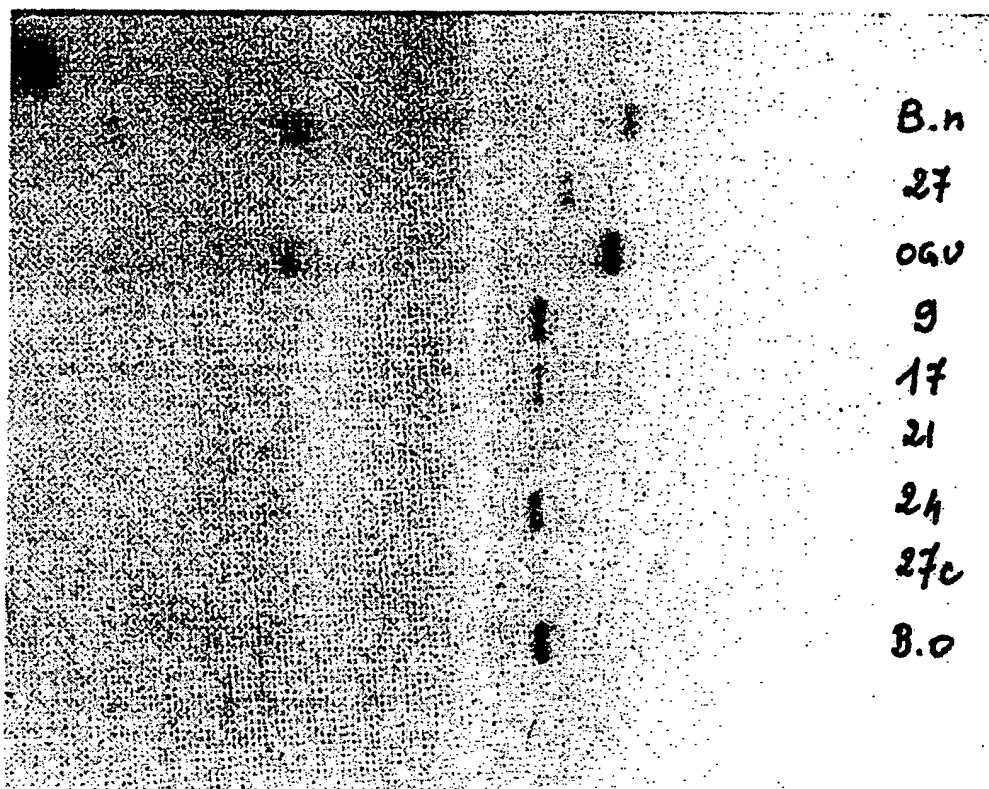


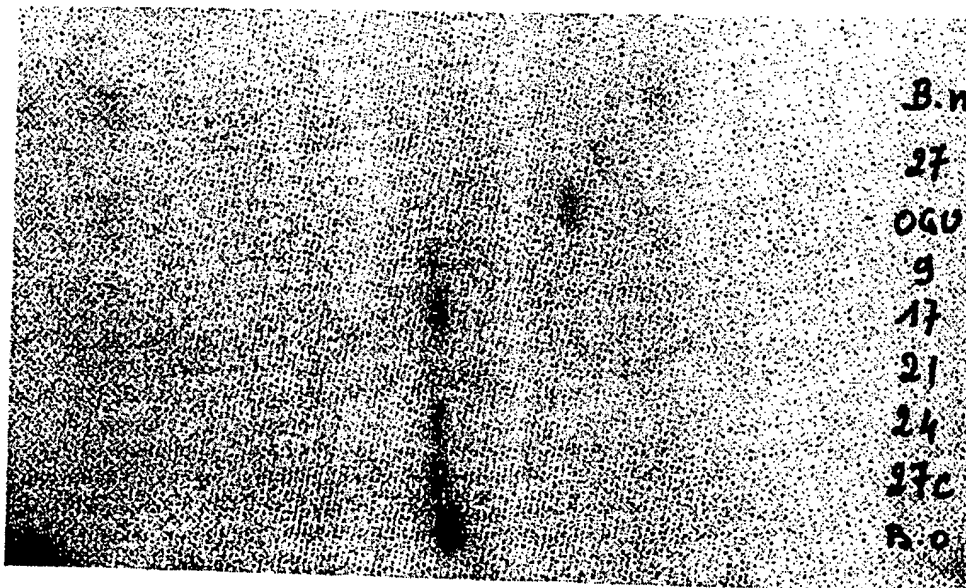
FIG. 2



B.n
27
060
9
17
21
24
27c
B.o

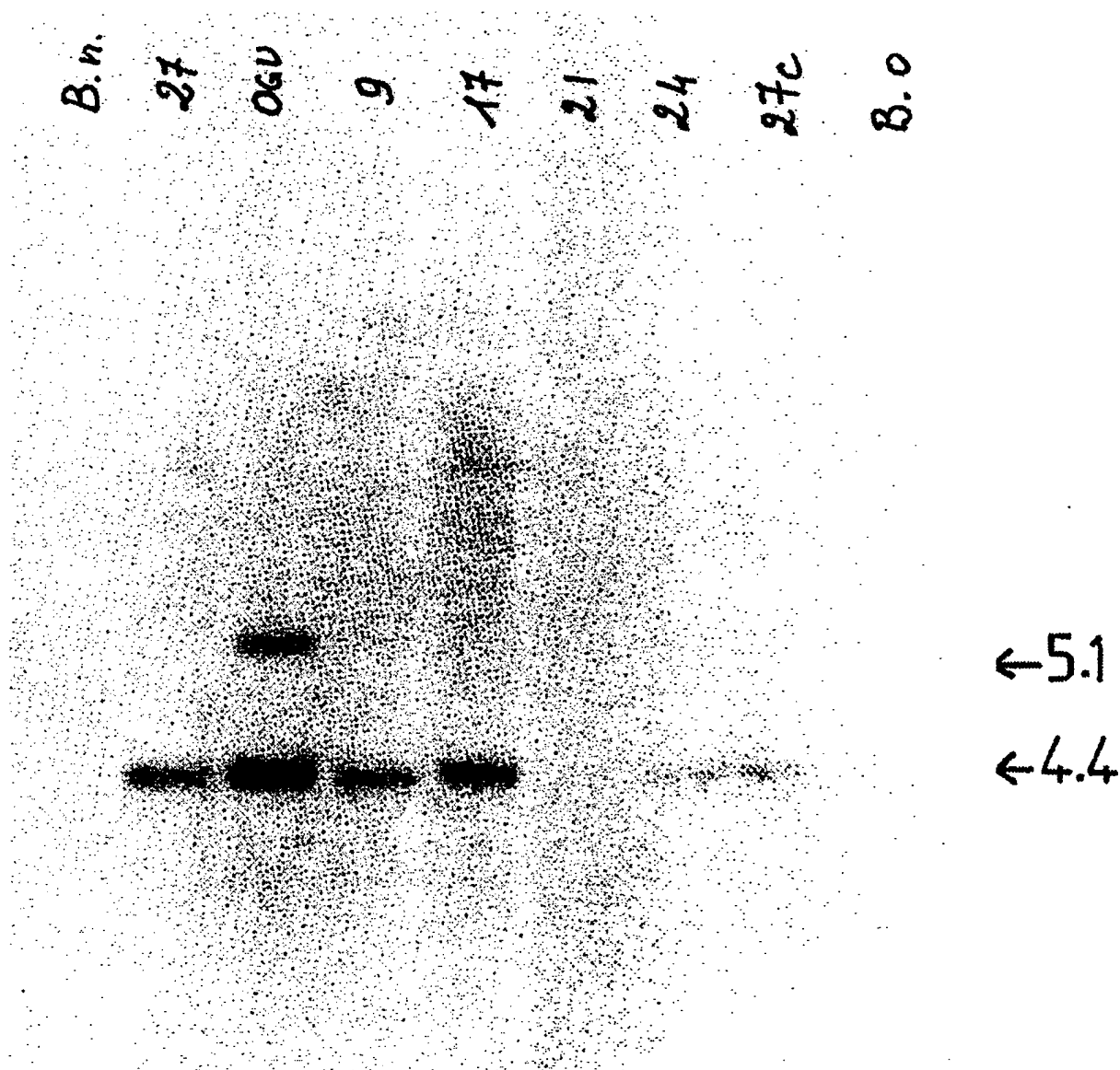
NruI(b)

FIG. 3



B.n
27
060
9
17
21
24
27c
B.o

Bgl I (a)



Sal I
FIG. 4

13/14

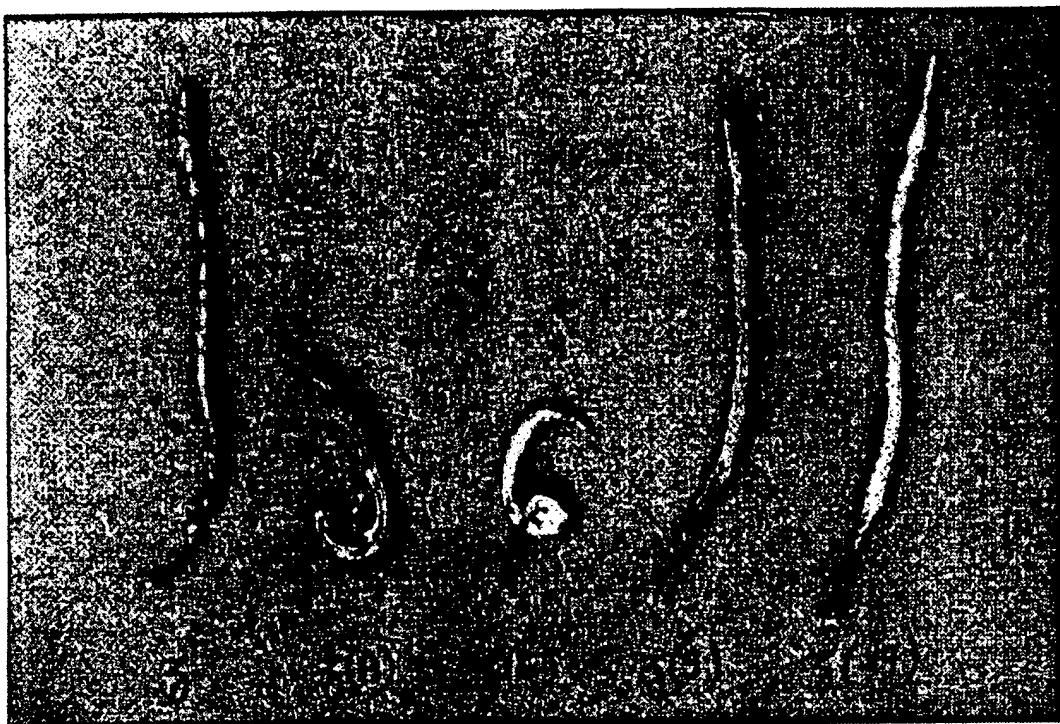
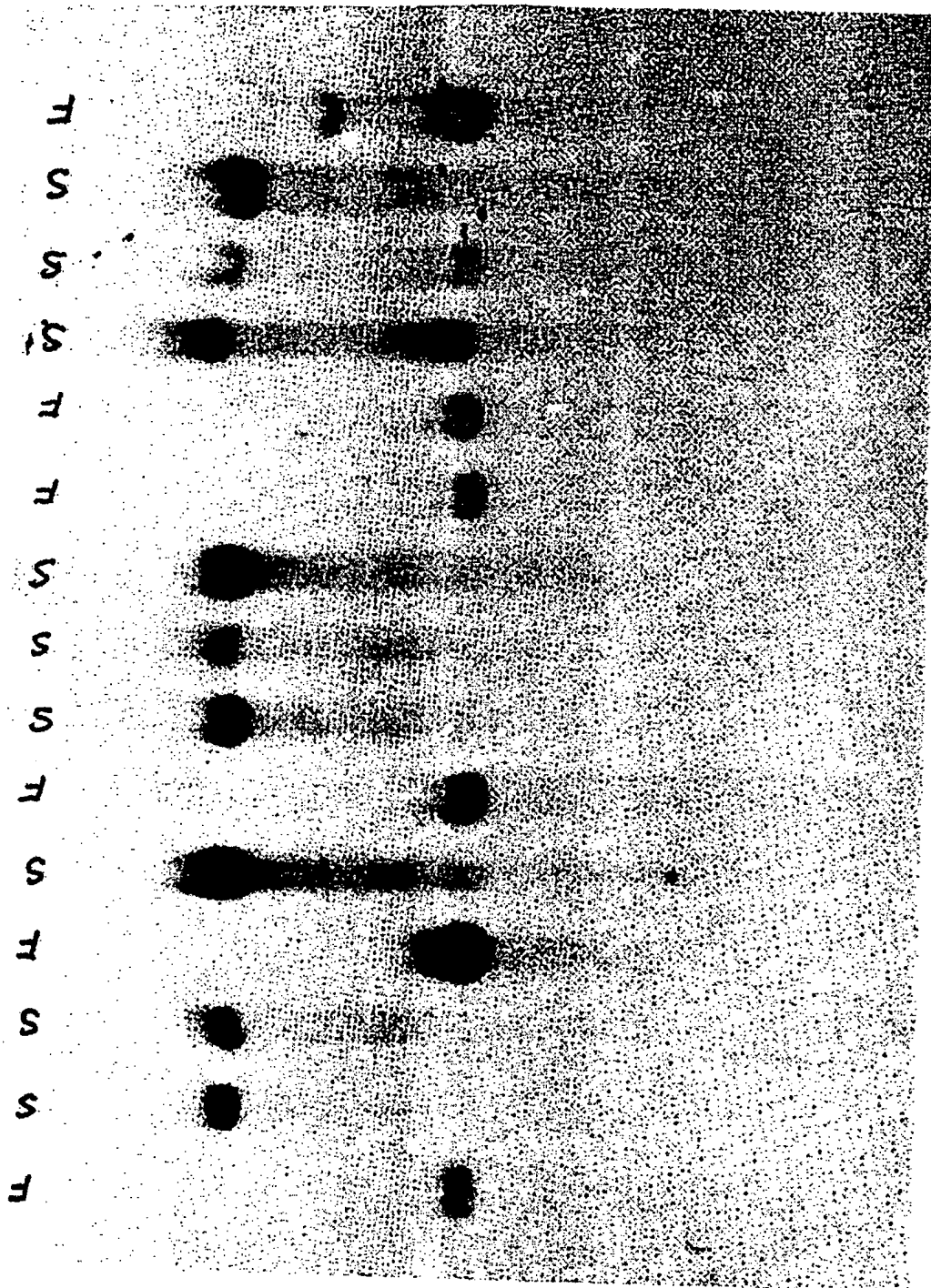


FIG. 5



1.4 FIG.6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR91/00741

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
IPC ⁵ : C12N 15/11; A01H 5/00; C12N 15/05; C12Q 1/68		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
IPC ⁵	C12N; A01H; C12Q	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	MOLECULAR & GENERAL GENETICS volume 191, 1983, pages 244-250; PELLETIER, G., ET AL.,: "Intergeneric cytoplasmic hybridization in cruciferae by protoplast fusion" see page 247, left-hand column ---	1-8,10-13, 15,23-27
X	THEOR. APPL. GENET volume 69, 1985, pages 361-366; CHETRIT, P., ET AL.,: "Mitochondrial DNA polymorphism induced by protoplast fusion in Cruciferae" see page 364; tables 1,2 ---	1-8,10-13, 15,23-27
X	PLANT PHYSIOL. BIOCHEM. volume 25, No. 3, 1987, pages 249-257; VEDEL, F., ET AL.,: "Mitochondrial DNA variation in cytoplasmic male sterile somatic hybrids of Brassica napus" see page 250, right-hand column ---	1-8,10-13, 15,23-27
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. volume 264 No. 20, 15 July 1989, BALTIMORE US pages 11706-11713; MAKAROFF, C. A., ET AL.,: "The atp6 coding region has been disrupted and a novel reading frame generated in the mitochondrial genome of cytoplasmic male- ./.	28
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>⁹ Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is compared with one or more other such documents, such comparison being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search 6 January 1992 (06.01.92)	Date of Mailing of this International Search Report 16 January 1992 (16.01.92)	
International Searching Authority European Patent Office	Signature of Authorized Officer	

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
P,X	sterile radish" see figure 2 sequences -169 to -58 and figure 7 sequences -169 to -58 --- CURR. GENET. volume 19, No. 2, February 1991, pages 121-127; BONHOMME, S., ET AL.,: "A 2.5kb NcoI fragment of Ogura radish mitochondrial DNA is correlated with cytoplasmic male-sterility in Brassica cybrids" see the whole document	1-8,10-13, 15,23-28
A	--- J. CELL. BIOCHEM. SUPPL. volume 13D, 1989, page 299; CONNETT, M. B., ET AL.,: "Plant transformation as a test of the relationship between cytoplasmic male sterility, respirator phenotype, and the PCF gene" see abstract M310	9,14
A	--- Biological abstracts v. 89, 1990, No. 14710 & THEOR. APPL. GENET. volume 78, No. 3, 1989, pages 445-455; JOURDAN, P. S., ET AL.,: "Synthesis of male sterile, triazine-resistant Brassica napus by somatic hybridization between cytoplasmic male sterile Brassica oleracea and atrazine-resistant Brassica campestris" see abstract	1-28
A	--- GB, A, 2211205 (ZAADUNIE) 28 June 1989 see the whole document	1-28
A	--- WO, A, 8701726 (ALLELIX) 26 March 1987 see the whole document -----	1-28

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9100741
SA 51902

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 06/01/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
GB-A-2211205	28-06-89	DE-A-	3842473	29-06-89
		FR-A-	2628601	22-09-89
		NL-A-	8803089	17-07-89

WO-A-8701726	26-03-87	AU-A-	6407786	07-04-87
		EP-A-	0238596	30-09-87

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

PCT/FR 91/00741

Demande internationale No

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification internationale et la CIB <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 5px;"> CIB 5 C12N15/11; A01H5/00; C12N15/05; C12Q1/68 </div>		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12N ; A01H ; C12Q	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ⁹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
X	MOLECULAR & GENERAL GENETICS vol. 191, 1983, pages 244 - 250; PELLETIER, G., ET AL.,: 'Intergeneric cytoplasmic hybridization in cruciferae by protoplast fusion' voir page 247, colonne de gauche <div style="text-align: center;">---</div>	1-8, 10-13, 15,23-27
X	THEOR. APPL. GENET vol. 69, 1985, pages 361 - 366; CHETRIT, P., ET AL.,: 'Mitochondrial DNA polymorphism induced by protoplast fusion in Cruciferae' voir page 364; tableaux 1,2 <div style="text-align: center;">==</div>	1-8, 10-13, 15,23-27
-/-		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> ⁹ Catégories spéciales de documents cités¹¹ ^a document définissant l'état général de la technique, sera considéré comme particulièrement pertinent ^e document antérieur, mais publié à la date du dépôt international ou après cette date ^l document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une mise spéciale (telle qu'indiquée) ^o document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens ^p document publié avant la date du dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée </div> <div style="width: 45%;"> ^u document antérieur publié postérieurement à la date du dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinente, mais cité pour corroborer le principe ou la théorie existant en base de l'invention ^x document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive ^y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier. ^z document qui fait partie de la même famille de brevets </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">06 JANVIER 1992</div>	Date d'achèvement du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">16 JAN 1992</div>	
Administration chargée de la recherche internationale <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">OFFICE EUROPEEN DES BREVETS</div>	Signature du fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">MADDOX A.D. </div>	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDiques SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie ¹⁵	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
X	<p>PLANT PHYSIOL. BIOCHEM. vol. 25, no. 3, 1987, pages 249 - 257; VEDEL, F., ET AL.,: 'Mitochondrial DNA variation in cytoplasmic male sterile somatic hybrids of Brassica napus' voir page 250, colonne de droite</p> <p>---</p>	1-8, 10-13, 15,23-27
X	<p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. vol. 264, no. 20, 15 Juillet 1989, BALTIMORE US pages 11706 - 11713; MAKAROFF, C. A., ET AL.,: 'The atp6 coding region has been disrupted and a novel reading frame generated in the mitochondrial genome of cytoplasmic male-sterile radish' voir fig 2 séquence -169 à -58 et fig. 7 séquence -169 à -58</p> <p>---</p>	28
P,X	<p>CURR. GENET. vol. 19, no. 2, Février 1991, pages 121 - 127; BONHOMME, S., ET AL.,: 'A 2.5kb NcoI fragment of Ogura radish mitochondrial DNA is correlated with cytoplasmic male-sterility in Brassica cybrids' voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-8, 10-13, 15,23-28
A	<p>J. CELL. BIOCHEM. SUPPL. vol. 13D, 1989, page 299; CONNETT, M. B., ET AL.,: 'Plant transformation as a test of the relationship between cytoplasmic male sterility, respirator phenotype, and the PCF gene' voir abrégé M310</p> <p>---</p>	9,14
A	<p>Biological abstracts v. 89, 1990, no.14710 & THEOR. APPL. GENET. vol. 78, no. 3, 1989, pages 445 - 455; JOURDAN, P. S., ET AL.,: 'Synthesis of male sterile, triazine-resistant Brassica napus by somatic hybridization between cytoplasmic male sterile Brassica oleracea and atrazine-resistant Brassica campestris' voir abrégé</p> <p>---</p>	1-28
A	<p>GB,A,2 211 205 (ZAADUNIE) 28 Juin 1989 voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-28

-/-

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDiques SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie ¹⁵	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
A	WO,A,8 701 726 (ALLELIX) 26 Mars 1987 voir le document en entier ---	1-28

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9100741
SA 51902

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets. 06/01/92

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
GB-A-2211205	28-06-89	DE-A- 3842473	29-06-89
		FR-A- 2628601	22-09-89
		NL-A- 8803089	17-07-89

WO-A-8701726	26-03-87	AU-A- 6407786	07-04-87
		EP-A- 0238596	30-09-87

EPO FORM P472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82